مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۴، شماره ۲، سال ۱۳۹۷

آنالیز چند متغیره پارامترهای کاریوتیپ در کلون‌های حاصل از توده‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) از ترکیه

Multivariate Analysis of Karyotype Parameters in Clones of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Accessions from Turkey

عیسی ظریفی[۱]، جعفر سری سویم آی[۲] و صباحتدین آل بایراک[۳]

۱- عضو هیات علمی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- استاد دانشگاه آنکارا، آنکارا، ترکیه
۳- استاد دانشگاه سلیمان دمیرل، ایسپارتا، ترکیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۳

چکیده

ظریفی، ع.، سری سویم آی، ج.، آل بایراک، ص. ۱۳۹۷. آنالیز چند متغیره پارامترهای کاریوتیپ در کلون های حاصل از توده‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) از ترکیه. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۴:** ۱۷۷-۲۰۱. 10.22092/spij.2018.118834

سیزده پارامتر کاریوتیپی در کلونهای حاصل از ده توده یونجه *Medicago sativa* L. از ژرم پلاسم مناطق دریاچه‌ای استان‌های ترکیه با استفاده از آنالیز چند متغیره، مورد مطالعه قرار گرفتند. مریستم‌های نوک ریشه‌ای با استوایرون هماتوکسیلن رنگ‌آمیزی شدند. همه کلونهای توده‌ها تتراپلوئید و دارای ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم و اندازه کروموزوم‌ها خیلی کوچک در محدوده ۵/۹۲-۱/۶۹ میکرون بودند. هتروژنی کلونهای توده‌های یونجه در این مناطق به سبب پدیده‌های کروموزوم‌های B و هترومورف محرز شد و تفاوت‌های معنی‌دار برای بیشتر صفات در بین توده‌ها مشاهده شد. بر اساس فرمول کاریوتیپی، کلونها دارای دو تیپ کروموزوم (متاسانتریک (m) و ساب متاسانتریک (sm)) بودند که در هشت تراد مختلف کلاس‌بندی شدند. تقارن و عدم تقارن کاریوتیپ کلونهای توده‌ها با استفاده از شاخص‌های مختلف: استبینز، A1 و A2 زارکو، درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF%)، ضریب تغییرات (CV%)، شاخص پراکندگی کاریوتیپ (DI) و اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) ارزیابی شدند. ضرایب همبستگی صفات کاریوتیپ نشان داد که بازوی بلند کروموزوم‌ها همبستگی بیشتر و مثبتی با طول کل کروموزوم‌ها داشت و بازوی کوتاه کمترین همبستگی را با نسبت بازوها نشان داد. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی حدود ۸۲/۳۷ درصد از واریانس و تنوع موجود در بین کلونهای توده ها با تغییرات طول کروموزوم‌ها، محل و موقعیت سانترومر در کاریوتیپ و شاخص نامتقارنی کاریوتیپ تبیین شد. آنالیز کلاستر با روش Ward و فواصل با روش اقلیدسی مربع تعیین و چهار گروه در دندروگرام مشخص شد.

واژه‌های کلیدی: سیتوژنتیک، سینتتیک، عدم تقارن، کروموزوم B، هترومورف.

نویسنده مسئول: e.zarifi@areeo.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۲۷۰۱۲۶۰

مقدمه

یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای چند ساله در تمام دنیا یونجه (.*Medicago sativa* L) است که به جهت داشتن همزیستی خوب و شناخته شده با باکتری‌های ریزوبیوم، از منابع بسیار مهم و مؤثر تثبیت نیتروژن زیستی و منبع مهم پروتئین برای دام می‌باشد (Yu *et al*., 2013). یونجه به‌عنوان "ملکه گیاهان علوفه‌ای" (Russelle, 2001; Veronesi *et al*., 2010) به جهت داشتن ارزش علوفه و بازده تولید علوفه بالا، سهولت کشت و کار، داشتن مقاومت به بیماری‌ها، حشرات و نماتودها و سازگاری گسترده به انواع شرایط محیطی در بین دیگر گیاهان علوفه‌ای از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Russelle, 2001).

مجموعه یونجه *Medicago sativa* موجود در پوشش گیاهی طبیعی کشور ترکیه، دارای سه کلاس مورفولوژیکی قابل تشخیص شامل (۱) گل‌های بنفش و نیام حلقه‌ای؛ (۲) گل‌های زرد و نیام غیر حلقه‌ای (۳) حد واسط و متشکل از هر دو می‌باشد. در این مجموعه مطالعات کروموزومی بر روی ۳۲۹ گیاه که نمایانگر ۸۷ جمعیت وحشی و ۳۵ کولتیوار یونجه بود انجام شده است. همه کولتیوارهای جمع‌آوری شده در کلاس مورفولوژی (۱) قرار گرفتند و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) بودند.

گیاهان وحشی هر سه کلاس مورفولوژی را دارا بودند و هر دو سطح پلوئیدی، دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) را نشان دادند. نمونه‌های هیبرید واقع در حد واسط کلاس‌های (۱) و (۲) نیز هر دو سطح پلوئیدی را نشان دادند. در بیشتر جمعیت‌ها سطح پلوئیدی گیاهان یکسان بودند اما در تعداد کمی از آنها مخلوطی از هر دو سطح پلوئیدی دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) مشاهده شده است. در چندین منطقه جمعیت‌های دیپلوئید و تتراپلوئید در کنار هم رشد یافته‌اند. بر خلاف دیپلوئیدها که در مناطق شمالی ترکیه سازگار شده‌اند تتراپلوئیدها پراکنش بیشتری را در تمام این کشور نشان دادند (Small and Bauchan, 1984).

مطالعات سیتوژنتیکی بر روی یونجه و گونه‌های نزدیک و خویشاوند آن نسبت به دیگر محصولات زراعی کمتر بوده و سخت می‌باشد، زیرا کروموزوم‌های این گیاه بسیار کوچک بوده، طول آنها در سلول‌های نوک ریشه ۲-۳ میکرومتر است و از نظر مورفولوژیکی بسیار به هم شبیه می باشند، تعداد کروموزوم‌های آن زیاد (۲n=۴x=۳۲) و اتوتتراپلوئید طبیعی که چهار ژنوم تقریباً یکسان (Bauchan and Hossain, 1997) را دارا می‌باشد. اما ظریفی و همکاران با استفاده از روش اسکواش بهبود یافته (Agayev *et al*., 2010; Zarifi *et al*., 2006; Zarifi and Güloğlu, 2016)، کروموزوم‌های

جمعیت‌های مختلف یونجه‌ها را در مناطق متفاوت ترکیه مورد بررسی قرار داده‌اند و کاریوتیپ آنها را تعیین کرده‌اند (Zarifi *et al.*, 2018).

در این تحقیق به منظور تعیین شباهت‌ها و تفاوت‌های کروموزومی کلونهای حاصل از ده توده مهم یونجه سازگار شده در شرایط آب و هوایی مناطق آناتولی میانی ترکیه، آنالیز آماری چند متغیره بر روی ویژگی‌های کاریوتیپ و شاخص‌های مهم تقارن و عدم تقارن آنها استفاده شده است تا در راستای اهداف برنامه به نژادی تولید ارقام سنتیتیک و برنامه‌ریزی فرآیندهای دورگ گیری و پلی کراس بکار گرفته شوند.

مواد و روش‌ها

از پوشش‌های گیاهی طبیعی یونجه (*Medicago sativa* L.) واقع در مناطق دریاچه‌ای استان‌های ترکیه (Burdur، Isparta، Afyon و Konya) بر اساس روش ظریفی و همکاران (Zarifi *et al.*, 2018) ده جمعیت انتخاب و کلون تهیه شده و در آنالیز کاریوتیپ مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). در این تحقیق یک توده زراعی یونجه مراغه (*Medicago sativa* L. cv. Maragheh) از ایران نیز استفاده شده است. مطالعات کروموزوم‌های سوماتیکی و آنالیز کاریوتیپ کلونهای توده های یونجه (*Medicago sativa* L.) مطابق روش ظریفی و همکاران (Zarifi *et al.*, 2018) و ظریفی و گول اوغلی (Zarifi and Güloğlu, 2016) انجام شده است.

اندازه‌گیری پارامترهای کروموزوم‌ها در ۱۰-۵ صفحه متافازی بر اساس بزرگنمایی با استفاده از نرم‌افزار Micromeasure 3.3 (Reeves, 2001) انجام گردید. نام‌گذاری و کلاس‌بندی کروموزوم‌ها با توجه به محل سانترومر از روش لوان و همکاران (Levan *et al.*, 1964) استفاده شد.

خصوصیات عددی کاریوتیپ نمونه ها: بازوی بلند (L)، بازوی کوتاه (S)، نسبت بازوها (Arm ratio)، میانگین طول کروموزوم‌ها، طول نسبی کروموزوم‌ها، شاخص سانترومری و خطای استاندارد با استفاده از نرم‌افزارهای آماری (Microsoft Excell) Excell 13 و SPSS v16 محاسبه گردید. تجزیه واریانس داده‌های پارامترهای کاریوتیپ کلونهای توده ها بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تعداد ۱۰-۱ تکرار انجام شد.

بر اساس اندازه مورفومتریک کروموزوم‌ها و مورفولوژی آنها کروموزوم‌های همولوگ در نمونه ها مشخص شده و کاریوگرام و ایدئوگرام آنها بر اساس داده‌های کروموزوم‌های همولوگ تهیه شد. پارامترهای عدم تقارن کاریوتیپ نمونه ها با استفاده از روش زارکو (Zarco, 1986) با دو پارامتر A1 و A2 انجام شد. کلاس‌بندی کاریوتیپ‌ها (SC) بر اساس استبینز (Stebbins, 1971) با در نظر گرفتن درجه

جدول ۱- شمارش کروموزومی و فرمول کاریوتیپ کلون‌های حاصل از توده‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) جمع‌آوری شده

Table 1. Chromosome number and karyotype formula of clones of alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions

ردیف No.	محل Location	x	تعداد کروموزوم Chromosome No.	فرمول کاریوتیپ Karyotype Formula
1	Turkey/ Burdur/ Yeşilova-3	8	2n= 4x= 32	20 m+ 4sm + 4~sm+ $4sm^{sat}$
2	Turkey / Burdur/ Bucak-2	8	2n= 4x= 32	24m+ 4~sm + $4\sim sm^{sat}$ + 2B
3	Turkey / Isparta/ Eğirdir-2	8	2n= 4x= 32	28m+ $4\sim sm^{sat}$
4	Turkey / Isparta/ Ş. Karaağaç-2	8	2n= 4x= 32	28m + $4m^{sat}$
5	Turkey / Isparta/ Yalvaç-3	8	2n= 4x= 32	28m+ $4sm^{sat}$
6	Turkey / Isparta/ Senirkent-2	8	2n= 4x= 32	28m+ $4\sim sm^{sat}$
7	Turkey / Afyon/ Çay-2	8	2n= 4x= 32	24m+ 4sm+ $4m^{sat}$
8	Turkey / Afyon/ Sultandağı-1	8	2n= 4x= 32	28m+ $4sm^{sat}$
9	Turkey / Afyon/ Bolvadin-3	8	2n= 4x= 32	28m+ $4\sim sm^{sat}$
10	Turkey / Konya/ Beyşehir-1	8	2n= 4x= 32	24m+ 4~sm+ $4sm^{sat}$
11	Iran/ cv. Maragheh	8	2n= 4x= 32	24m+ 4sm+ $4sm^{sat}$

نامتقارنی انجام شد. پارامترهای تقارن کاریوتیپ در کلونهای توده ها شامل درصد شکل کلی کاریوتیپ (Total Form = TF%) (Huziwara, 1962)، طول نسبی کروموزوم (RL%) (Gennur *et al.*, 1988) و شاخص پراکنش (DI) (Lavania and Srivastava, 1999, 1992) نیز برای آنها محاسبه گردید. علاوه بر پارامترهای ذکر شده برای اندازه‌گیری عدم تقارن کاریوتیپ، شاخص دیگری نیز برای ارزیابی درجه نامتقارنی کاریوتیپ (Asymmetry Index = AI) در یک مجموعه کروموزوم که توسط واتاناب و همکاران (Watanabe *et al.*, 1999) ارائه شده است، انجام گرفت.

مقایسه پارامترهای کاریوتیپ کلونهای توده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری ذکر شده در بالا انجام گرفت و جهت تخمین میانگین فاصله تاکسونومیکی بین کلونها و رسم فنوگرام از داده‌های ماتریس استاندارد شده توسط نرم‌افزار NTSYS-PC استفاده گردید (Rohlf, 1998).

نتایج و بحث

تعداد کروموزوم‌ها و تتراپلوئیدی بودن کلون‌های توده ها تفاوتی را نشان ندادند، اما در کاریوتیپ کروموزوم‌های سوماتیکی آنها تفاوت‌های اساسی مشاهده شد (جدول ۲). یونجه (*Medicago sativa* L.) با ۲n = ۴x = ۳۲ کروموزوم اتوتتراپلوئید، هر

جدول ۲- اندازه‌گیری‌های (µm) کروموزوم‌های سوماتیکی برای کلون‌های حاصل از ۱۰ توده یونجه از ترکیه و یک جمعیت از ایران. L: طول بازوی بلند کروموزوم (mµ)، S: طول بازوی کوتاه کروموزوم (mµ)، CI: شاخص سانترومری، (m: متاسانتریک، sm: ساب متاسانتریک، st: ساب تلوسانتریک)، Sat: ساتلایت یا قمر، L% و S%: شاخص سهم هر بازوی کروموزوم نسبت به طول کل کاریوتیپ، RL%: طول نسبی کروموزوم و TC: طول کل کروموزوم مجموعه هاپلوئیدی.

Table 1. Measurements (mµ) of somatic chromosomes for clones from 10 alfalfa accessions from Turkey and one population from Iran. L: Length of the long arm of the chromosome (µm), S: Length of the short arm of the chromosome (µm), CI: Centromer index, (m: Metacentric, sm: Submetacentric,st: Submetacentric); sat Satellites, L% and S%: Indices that express the contribution of each arm of each chromosome to the total length of karyotype, RL%: Relative length of chromosomes and TC: Total length of haploid set chromosomes.

شماره جفت Pair No.	طول کل Total (L+S) µm	بازوی بلند Long arm (L) µm	بازوی کوتاه Short arm (S) µm	نسبت بازوها Armratio (AR=L/S)	شاخص سانترومری CI (S*100/(L+S))	ماهواره Sat	تیپ Type	درصد بازوی بلند L%	درصد بازوی کوتاه S%	طول نسبی کروموزوم RL%
1. Yeşilova-3										
1	**2.85± 0.11**	**1.80± 0.08**	**1.05± 0.03**	**1.71± 0.06**	**37**	**-**	**sm**	**8.77**	**5.14**	**13.91**
2	2.71± 0.10	1.49± 0.06	1.22± 0.05	1.23± 0.04	45	-	**m**	7.28	5.95	13.23
3	2.60± 0.11	1.45± 0.08	1.15± 0.04	1.27± 0.06	44	-	**m**	7.10	5.61	12.71
4	**2.52± 0.07**	**1.56± 0.05**	**0.97± 0.03**	**1.62± 0.05**	**38**	**-**	**~sm**	**7.61**	**4.71**	**12.32**
5	2.41± 0.06	1.31± 0.02	1.10± 0.05	1.23± 0.07	45	-	**m**	6.41	5.37	11.78
6	2.32± 0.07	1.26± 0.04	1.06± 0.04	1.21± 0.05	46	-	**m**	6.17	5.17	11.34
7	2.21± 0.08	1.17± 0.05	1.04± 0.04	1.13± 0.03	47	-	**m**	5.72	5.06	10.77
8	**2.85± 0.12**	**1.34± 0.05**	**0.82± 0.05**	**1.66± 0.06**	**29**	**0.82**	**~sm**	**6.56**	**8.01**	**13.93**
Mean	2.56± 0.04	1.42± 0.03	1.05± 0.02	1.38± 0.03						
Total (TC)= 20.47		**طول کل کروموزوم**						**55.62**	**45.02**	
2. Bucak-2										
1	**3.52± 0.12**	**2.18± 0.08**	**1.34± 0.06**	**1.65± 0.06**	**38**	**-**	**~sm**	**8.69**	**5.32**	**14.01**
2	3.40± 0.15	1.87± 0.09	1.53± 0.07	1.23± 0.04	45	**-**	**m**	7.46	6.10	13.56
3	3.24± 0.13	1.75± 0.08	1.49± 0.07	1.18± 0.05	46	-	m	6.97	5.94	12.91
4	**3.11± 0.12**	**1.81± 0.09**	**1.29± 0.05**	**1.41± 0.05**	**42**	**-**	**m**	**7.22**	**5.15**	**12.38**
5	2.97± 0.10	1.58± 0.04	1.39± 0.06	1.15± 0.04	47	-	**m**	6.28	5.53	11.81
6	2.74± 0.09	1.48± 0.05	1.26± 0.05	1.19± 0.05	46	-	**m**	5.90	5.00	10.90
7	2.49± 0.10	1.40± 0.06	1.09± 0.05	1.31± 0.06	44	-	**m**	5.57	4.33	9.90
8	**3.65± 0.14**	**1.60± 0.08**	**1.02± 0.06**	**1.59± 0.06**	**28**	**1.03**	**~sm**	**6.38**	**8.15**	**14.53**
Mean	3.14± 0.06	1.71± 0.03	1.30± 0.03	1.34± 0.03						
Total (TC)= 25.11		**طول کل کروموزوم**						**54.47**	**45.51**	
3. Eğirdir-2										
1	2.56± 0.03	1.45± 0.04	1.12± 0.02	1.31± 0.06	44	**-**	**m**	7.66	5.91	13.57
2	**2.47± 0.04**	**1.54± 0.02**	**0.94± 0.02**	**1.65± 0.03**	**38**	**-**	**m**	8.15	4.96	13.10
3	2.39± 0.04	1.33± 0.03	1.06± 0.03	1.27± 0.05	44	-	m	7.06	5.61	12.67
4	2.31± 0.04	1.31± 0.03	1.00± 0.03	1.33± 0.05	43	**-**	**m**	6.94	5.28	12.22
5	2.23± 0.03	1.20± 0.02	1.03± 0.02	1.17± 0.03	46	-	**m**	6.35	5.45	11.81
6	2.12± 0.03	1.11± 0.02	1.01± 0.02	1.11± 0.02	47	-	**m**	5.90	5.33	11.23
7	1.97± 0.03	1.05± 0.02	0.93± 0.02	1.13± 0.03	47	-	**m**	5.54	4.91	10.45
8	2.83± 0.07	1.25± 0.05	0.76± 0.02	1.67± 0.07	27	**0.82**	**~sm**	6.64	8.34	14.98
Mean	2.36± 0.03	1.28± 0.02	0.98± 0.01	1.33± 0.03						
Total (TC)= 18.88		**طول کل کروموزوم**						**54.24**	**45.78**	

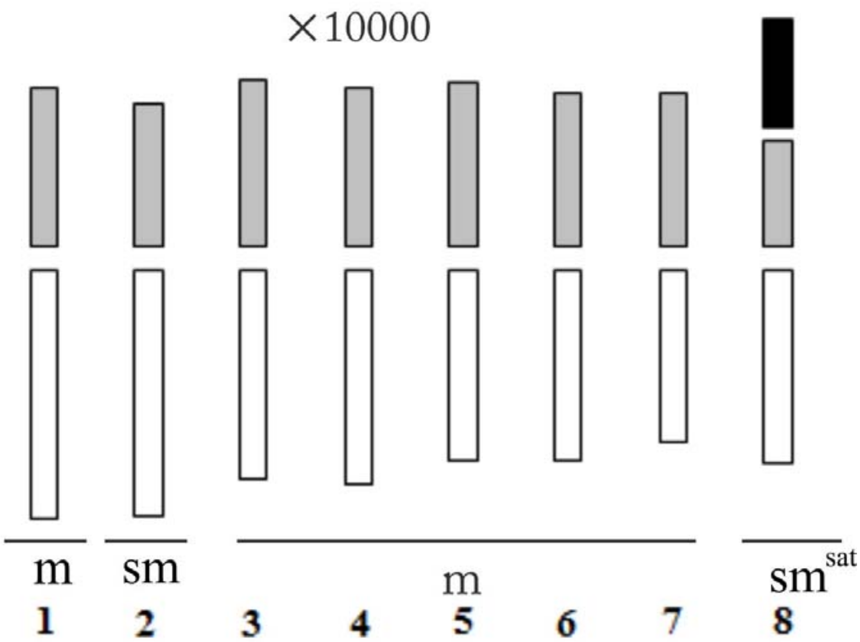
Table 2. continued | ادامه جدول ۲

4. Ş. Karaağaç-2										
1	3.28± 0.15	1.87± 0.09	1.41± 0.06	1.34± 0.05	43	-	m	7.88	5.92	13.80
2	3.15± 0.17	1.89± 0.13	1.25± 0.05	1.51± 0.06	40	-	m	7.96	5.27	13.23
3	3.05± 0.15	1.75± 0.11	1.30± 0.05	1.35± 0.06	43	-	m	7.37	5.45	12.81
4	2.92± 0.13	1.69± 0.09	1.23± 0.06	1.39± 0.06	42	-	m	7.12	5.16	12.28
5	2.79± 0.12	1.52± 0.08	1.27± 0.05	1.20± 0.04	46	-	m	6.39	5.32	11.71
6	2.72± 0.13	1.54± 0.08	1.19± 0.07	1.32± 0.07	44	-	m	6.46	4.98	11.45
7	2.51± 0.11	1.30± 0.05	1.20± 0.06	1.09± 0.02	48	-	m	5.47	5.06	10.54
8	3.37± 0.16	1.38± 0.07	0.96± 0.05	1.44± 0.03	28	**1.03**	m	5.80	8.36	14.16
Mean	2.97± 0.06	1.62± 0.04	1.23± 0.02	1.33± 0.02						
Total (TC)= 23.79	**طول کل کروموزوم**							**54.45**	**45.53**	
5. Yalvaç-3										
1	3.62± 0.20	2.10± 0.12	1.52± 0.09	1.40± 0.05	42	-	m	8.03	5.80	13.82
2	**3.42± 0.18**	**2.15± 0.12**	**1.27± 0.06**	**1.68± 0.03**	**37**	**-**	**m**	**8.19**	**4.86**	**13.05**
3	3.36± 0.14	1.88± 0.09	1.48± 0.07	1.27± 0.05	44	-	m	7.17	5.66	12.82
4	3.16± 0.16	1.82± 0.10	1.34± 0.07	1.37± 0.05	42	-	m	6.94	5.11	12.05
5	3.11± 0.14	1.69± 0.08	1.41± 0.07	1.21± 0.04	45	-	m	6.46	5.38	11.85
6	2.93± 0.14	1.56± 0.06	1.37± 0.08	1.15± 0.04	47	-	m	5.93	5.23	11.16
7	2.62± 0.14	1.38± 0.07	1.25± 0.07	1.11± 0.03	48	-	m	5.25	4.76	10.01
8	3.99± 0.21	1.99± 0.13	0.99± 0.05	2.02± 0.08	25	**1.02**	**sm**	7.58	7.65	15.23
Mean	3.28± 0.07	1.82± 0.04	1.33± 0.03	1.40± 0.03						
Total (TC)= 26.21	**طول کل کروموزوم**							**55.55**	**48.45**	
6. Senirkent-2										
1	3.51± 0.19	2.07± 0.13	1.45± 0.09	1.45± 0.08	41	-	m	8.27	5.78	14.04
2	3.25± 0.19	1.81± 0.11	1.44± 0.09	1.26± 0.04	44	-	m	7.23	5.75	12.98
3	3.22± 0.18	1.91± 0.11	1.31± 0.07	1.47± 0.03	41	-	m	7.64	5.22	12.86
4	3.14± 0.20	1.73± 0.12	1.41± 0.09	1.23± 0.03	45	-	m	6.90	5.63	12.53
5	2.88± 0.19	1.58± 0.09	1.30± 0.10	1.23± 0.04	45	-	m	6.31	5.21	11.51
6	2.77± 0.16	1.47± 0.08	1.30± 0.08	1.14± 0.04	47	-	m	5.87	5.20	11.07
7	2.67± 0.15	1.44± 0.09	1.23± 0.08	1.19± 0.05	46	-	m	5.77	4.90	10.67
8	3.59± 0.21	1.56± 0.09	1.01± 0.06	1.56± 0.05	28	**1.02**	**~sm**	6.23	8.10	14.33
Mean	3.13± 0.07	1.70± 0.04	1.30± 0.03	1.32± 0.02						
Total (TC)= 25.02	**طول کل کروموزوم**							**54.22**	**45.78**	
7. Çay-2										
1	4.17± 0.28	2.38± 0.19	1.79± 0.11	1.34± 0.07	43	-	m	7.98	5.97	13.95
2	**3.93± 0.22**	**2.48± 0.15**	**1.45± 0.07**	**1.70± 0.03**	**37**	**-**	**sm**	**8.29**	**4.85**	**13.14**
3	3.80± 0.21	2.13± 0.11	1.66± 0.12	1.31± 0.05	44	-	m	7.13	5.56	12.70
4	3.67± 0.18	2.07± 0.13	1.60± 0.06	1.29± 0.05	44	-	m	6.92	5.35	12.26
5	3.50± 0.18	1.99± 0.14	1.51± 0.06	1.32± 0.07	43	-	m	6.67	5.05	11.72
6	3.33± 0.19	1.78± 0.09	1.55± 0.10	1.17± 0.04	46	-	m	5.95	5.17	11.12
7	3.11± 0.17	1.68± 0.11	1.44± 0.07	1.17± 0.07	46	-	m	5.60	4.81	10.41
8	**4.40± 0.23**	**1.93± 0.10**	**1.28± 0.09**	**1.55± 0.07**	**29**	**1.18**	**m**	**6.47**	**8.23**	**14.71**
Mean	3.74± 0.08	2.06± 0.05	1.53± 0.03	1.36± 0.03						
Total (TC)= 29.90	**طول کل کروموزوم**							**55.02**	**44.99**	

Table 2. continued　　　　ادامه جدول ۲

				8. Sultandağı-1						
1	**4.41± 0.39**	**2.76± 0.27**	**1.65± 0.12**	**1.66± 0.05**	**38**	**-**	**m**	**8.65**	**5.16**	**13.81**
2	4.35± 0.37	2.56± 0.23	1.79± 0.15	1.44± 0.04	41	-	m	8.02	5.59	13.61
3	4.02± 0.33	2.16± 0.18	1.86± 0.16	1.18± 0.05	46	-	m	6.77	5.81	12.58
4	3.79± 0.33	2.04± 0.19	1.74± 0.14	1.17± 0.04	46	-	m	6.40	5.46	11.85
5	**3.79± 0.27**	**2.33± 0.21**	**1.46± 0.07**	**1.59± 0.09**	**39**	**-**	**m**	**7.30**	**4.56**	**11.86**
6	3.65± 0.27	1.90± 0.15	1.75± 0.13	1.08± 0.03	48	-	m	5.94	5.48	11.42
7	3.36± 0.28	1.73± 0.13	1.63± 0.15	1.07± 0.03	48	-	m	5.42	5.11	10.52
8	**4.58± 0.31**	**2.15± 0.17**	**1.04± 0.03**	**2.06± 0.14**	**23**	**1.40**	**sm**	**6.73**	**7.62**	**14.34**
Mean	3.99± 0.12	2.21± 0.08	1.61± 0.05	1.40± 0.05						
Total (TC)= 31.95	**طول کل کروموزوم**							**55.23**	**44.78**	
				9. Bolvadin-3						
1	**3.43± 0.06**	**2.06± 0.04**	**1.37± 0.03**	**1.51± 0.04**	**40**	**-**	**m**	**8.58**	**5.71**	**14.29**
2	3.16± 0.03	1.79± 0.04	1.37± 0.04	1.32± 0.06	43	-	m	7.47	5.69	13.17
3	3.03± 0.03	1.75± 0.04	1.28± 0.03	1.38± 0.06	42	-	m	7.28	5.32	12.61
4	2.91± 0.04	1.58± 0.04	1.33± 0.02	1.19± 0.04	46	-	m	6.58	5.55	12.13
5	2.75± 0.03	1.49± 0.03	1.26± 0.04	1.19± 0.06	46	-	m	6.20	5.25	11.45
6	2.63± 0.04	1.35± 0.02	1.29± 0.02	1.05± 0.01	49	-	m	5.61	5.36	10.97
7	2.43± 0.05	1.27± 0.03	1.16± 0.02	1.10± 0.03	48	-	m	5.30	4.82	10.13
8	**3.66± 0.12**	**1.46± 0.04**	**0.93± 0.06**	**1.60± 0.08**	**25**	**1.19**	**~sm**	**6.10**	**8.84**	**15.26**
Mean	2.99± 0.05	1.60± 0.03	1.25± 0.02	1.29± 0.03						
Total (TC)= 24.00	**طول کل کروموزوم**							**53.13**	**46.55**	
				10. Beyşehir-1						
1	3.23± 0.06	1.94± 0.05	1.28± 0.03	1.52± 0.04	40	-	m	8.15	5.38	13.54
2	3.12± 0.06	1.79± 0.04	1.33± 0.05	1.36± 0.05	43	-	m	7.50	5.59	13.09
3	2.98± 0.06	1.65± 0.04	1.32± 0.03	1.26± 0.03	44	-	m	6.94	5.56	12.50
4	**2.91± 0.07**	**1.80± 0.04**	**1.11± 0.04**	**1.65± 0.05**	**38**	**-**	**~sm**	**7.56**	**4.64**	**12.20**
5	2.84± 0.06	1.55± 0.04	1.29± 0.03	1.20± 0.03	46	-	m	6.49	5.43	11.92
6	2.69± 0.06	1.42± 0.03	1.26± 0.03	1.13± 0.02	47	-	m	5.98	5.30	11.28
7	2.48± 0.04	1.31± 0.03	1.17± 0.02	1.12± 0.03	47	-	m	5.48	4.91	10.39
8	**3.60± 0.10**	**1.58± 0.06**	**0.96± 0.04**	**1.72± 0.13**	**27**	**1.13**	**sm**	**6.64**	**8.79**	**15.10**
Mean	2.98± 0.04	1.63± 0.02	1.22± 0.02	1.37± 0.03						
Total (TC)= 23.83	**طول کل کروموزوم**							**54.74**	**45.60**	
				11. Iran/ CV. Maragheh						
1	5.02± 0.10	3.06± 0.09	1.95± 0.03	1.57± 0.05	38.96	-	m	8.35	5.32	13.70
2	4.80± 0.06	3.04± 0.04	1.76± 0.02	1.73± 0.02	36.58	-	sm	8.29	4.80	13.10
3	4.63± 0.05	2.59± 0.03	2.04± 0.04	1.28± 0.03	43.98	-	m	7.07	5.57	12.63
4	4.58± 0.04	2.63± 0.06	1.95± 0.02	1.35± 0.04	42.54	-	m	7.18	5.32	12.50
5	4.36± 0.09	2.34± 0.08	2.01± 0.05	1.17± 0.04	46.22	-	m	6.38	5.48	11.90
6	4.20± 0.07	2.34± 0.09	1.87± 0.10	1.27± 0.10	44.41	-	m	6.38	5.10	11.46
7	4.02± 0.08	2.12± 0.05	1.9± 0.05	1.12± 0.04	47.17	-	m	5.78	5.18	10.97
8	5.04± 0.14	2.38± 0.09	1.3± 0.05	1.83± 0.05	25.87	**1.35**	**sm**	6.49	3.55	13.75
Mean	4.58± 0.07	2.57± 0.06	1.85± 0.04	1.41± 0.05						
Total (TC)= 36.65	**طول کل کروموزوم**							**55.93**	**40.33**	

کرومـــــــوزوم همولـــــــوگ دو جفـــــــت (چهــار کرومــوزوم) بــوده و مطــابق الگــوی ارائـــه شـــده توســـط ظریفـــی و همکـــاران (Zarifi *et al.*, 2018) بـه‌عنـوان کاریوتیـپ استاندارد، در این تحقیق برای ایجاد کاریوتیپ کلون‌های توده های یونجه و رسم ایـدئوگرام و کاریوگرام آنها مـورد استفاده قـرار گرفـت. در این تحقیق کاریوتیپ و کاریوگرام نمونه یونجه (cv. Maragheh) مورد مطالعه از کشـور ایـران بـر اسـاس ایـن روش ایـدئوگرام آن تهیـه شـده (شــکل ۱) و بـرای مقایســه کاریوتیــپ دیگــر نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. کـاریوگرام و ایدئوگرام هاپلوئیدی کروموزوم‌های سـوماتیکی کلـون‌هـای تـوده‌هـا در شـکل ۲ بـرای مقایسـه مورفولـوژی کرومـوزوم‌هـای آنهـا نمـایش داده شـده و داده‌هـای پارامترهـای کاریوتیـپ‌هـا در جدول‌هـای ۱، ۲ و ۳ بـه‌طـور کامـل ارائـه شـده اسـت. شـاخص‌هـای عـدم تقـارن (A1 و A2) کاریوتیپ کلون‌های توده ها با اسـتفاده از روش زارکـو (Zarco, 1986) مشـخص شـده اسـت (شـــکل ۳) کـــلاس‌بنـــدی کاریوتیـــپ‌هـــا (Symmetry Class = SC) بـر اسـاس اسـتبینز (Stebbins, 1971) بـا در نظـر گـرفتن درجـه نامتقــارنی در ارائــه شــده اســت (جــدول ۲).



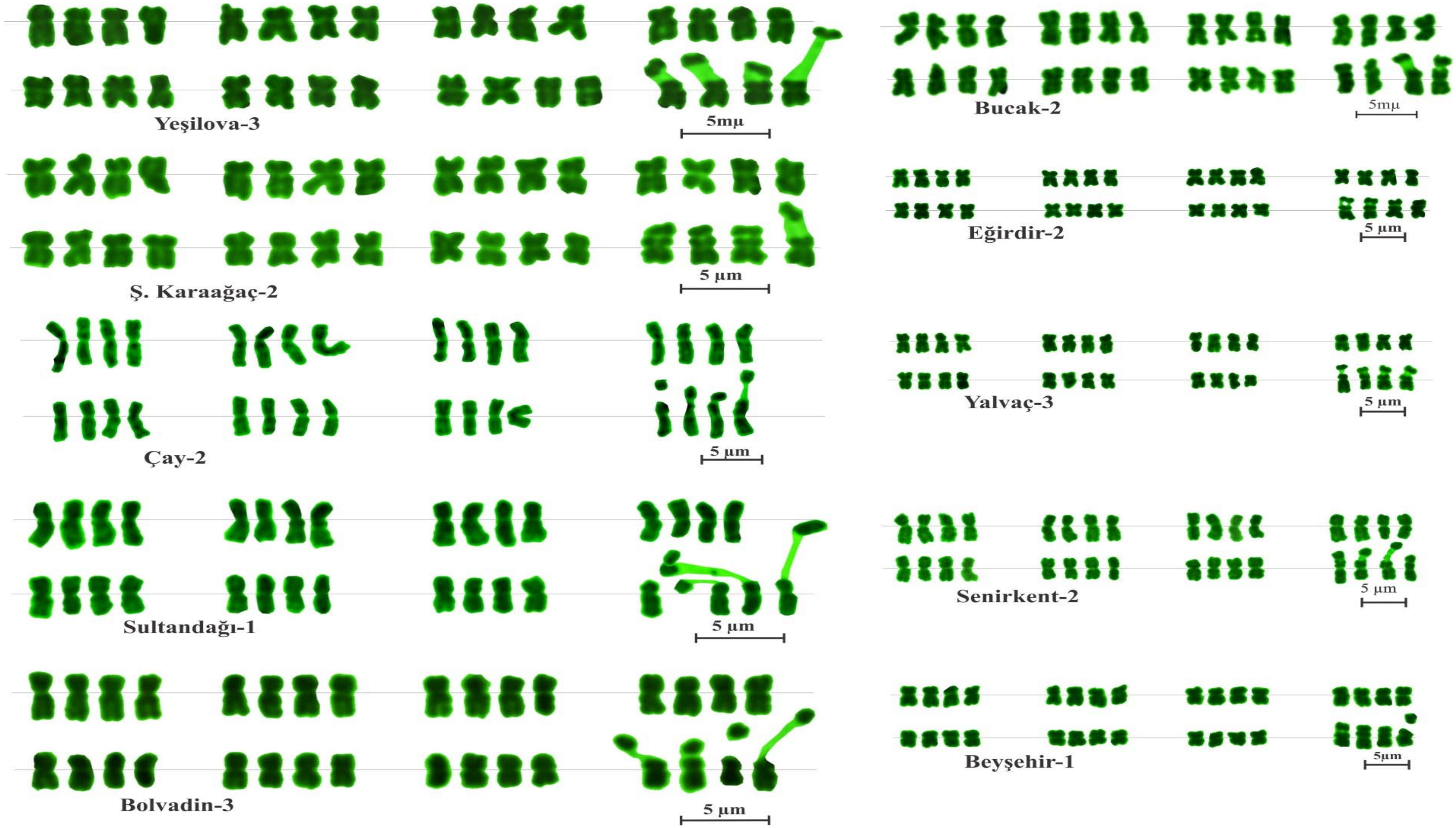
شکل ۱- ایدئوگرام و کاریوتیپ استاندارد نمونه یونجه (cv. Maragheh) از ایران مطابق روش ظریفی و همکاران (Zarifi *et al.*, 2018)

Fig. 1. Ideogram and standard karyotype of alfalfa accession of Iran (cv. Maragheh) according to the method by (Zarifi *et al.*, 2018)

جدول ۳- جزئیات کاریوتیپ کلون‌های حاصل از توده های یونجه مطالعه شده؛ فرمول کاریوتیپ (KF)، میانگین طول کروموزوم (میانگین (TL))، اندازه ساتلایت (SAT)، طول کل کروموزوم مجموعه هاپلوئیدی (TC)، دامنه اندازه کروموزوم‌ها (Interval)، A1 شاخص نامتقارن درون کروموزومی (intrachromosomal asymmetry) و A2 شاخص نامتقارن میان کروموزومی (interchromosomal asymmetry)، شاخص سانترومری (CI)، کلاس بندی کاریوتیپ‌ها بر اساس درجه نامتقارنی (SC) (Stebbins, 1971)، در صد شکل کلی کاریوتیپ (TF%)، ضریب تغییرات (CV%)، شاخص درجه نامتقارنی کاریوتیپ (AI)، شاخص پراکندگی کاریوتیپ (DI) و اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL).

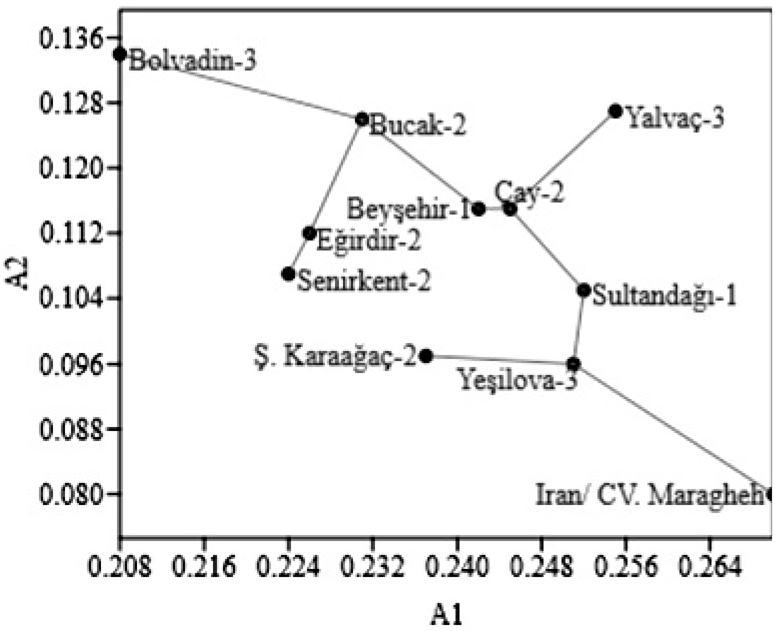
Table 2. Karyotype details of studied clones from alfalfa accessions; Karyotype formula (KF), The mean length of chromosomes (TL), size of satellite (SAT), Total length of haploid set chromosomes (TC), Range of chromosomes size (Interval), A1; Intrachromosomal asymmetry and A2; Interchromosomal asymmetry, Centromer index (CI), Symmetry class (SC) (Stebbins 1971), The total form percent (TF%), Coefficient of variation (CV%), The karyotype asymmetry index (AI), The dispersion index (DI) and difference of range of relative length (DRL).

نمونه Samples	فرمول کاریوتیپ KF	میانگین طول کروموزوم Mean (TL)	دامنه اندازه کروموزوم‌ها Interval	طول کل کروموزوم TC	شاخص سانترومری CI	ماهواره SAT	ضریب تغییرات CV%	درجه نامتقارنی AI	نامتقارن درون A_1	نامتقارن میان A_2	دامنه طول نسبی DRL	در صد شکل کلی TF%	شاخص پراگندگی DI	کلاس تقارن SC
Yeşilova-3	20 m+ 4sm + **4~sm**+ $4sm^{sat}$	2.56± 0.04	1.69- 3.69	20.47± 0.084	41.45	0.82	14.91	**0.142**	0.251	0.096	3.15	41.01	6.185	2B
Bucak-2	24m+ **4~sm** + $4\sim sm^{sat}$ + **2B**	3.14± 0.06	2.12- 4.57	25.11± 0.140	41.83	1.03	**17.54**	0.128	0.231	0.126	**4.63**	41.43	**7.337**	2B
Eğirdir-2	28m+ $4\sim sm^{sat}$	2.36± 0.03	1.83- 3.19	**18.88± 0.095**	42.04	0.82	12.04	0.123	0.226	0.112	4.54	41.44	4.994	2A
Ş. Karaağaç-2	28m + $4m^{sat}$	2.97± 0.06	1.94- 4.35	23.79± 0.104	41.72	1.03	**18.31**	0.127	0.237	0.097	3.63	41.21	**7.982**	1B
Yalvaç-3	28m+ $4sm^{sat}$	3.28± 0.07	1.73- 5.20	26.21± 0.150	41.30	1.02	**20.78**	**0.142**	0.255	0.127	**5.23**	40.56	**8.488**	2B
Senirkent-2	28m+ $4\sim sm^{sat}$	3.13± 0.07	2.05- 5.04	28.38± 0.163	42.09	1.02	**21.83**	0.122	0.224	0.107	3.67	41.72	**8.768**	1B
Çay-2	24m+ 4sm+ $4m^{sat}$	3.74± 0.08	2.44- 5.93	29.90± 0.151	41.58	1.18	**21.63**	0.135	0.245	0.115	4.30	41.03	**8.957**	2B
Sultandağı-1	28m+ $4sm^{sat}$	3.99± 0.12	2.50- 5.82	31.95± 0.149	41.22	1.40	**23.64**	0.138	0.252	0.105	3.82	40.41	**8.515**	2B
Bolvadin-3	28m+ $4\sim sm^{sat}$	2.99± 0.05	2.18- 4.24	24.00± 0.145	42.63	1.19	13.55	0.109	0.208	0.134	**5.13**	41.58	5.842	1A
Beyşehir-1	24m+ 4~sm+ $4sm^{sat}$	2.98± 0.04	2.24- 4.35	23.83± 0.121	41.51	1.13	13.89	0.134	0.242	0.115	4.71	40.85	5.756	2A
Iran/ cv. Maragheh	24m+ 4sm+ $4sm^{sat}$	4.58± 0.07	3.88- 5.37	36.65± 0.131	40.71	1.35	8.349	**0.152**	0.270	0.080	2.24	40.33	**3.473**	2A



شکل ۲- کاریوگرام کلون‌های توده های یونجه (*Medicago sativa* L.) ۲n=۴x=۳۲ مورد مطالعه، مطابق روش ظریفی و همکاران (Zarifi *et al*., 2018)

Fig. 2. Karyogram of studied clones from alfalfa accessions according to the method of standard karyotype (Zarifi *et al*., 2018)



شکل ۳- نمودار پراگندگی شاخص های عدم تقارن A1 و A2 کلونهای جاصل از توده های یونجه؛ ارزش های آنها در جدول ۳ خلاصه شده است.

Fig. 3. Scatter diagram for studied clones from alfalfa accessions based on A1 and A2 asymmetry parameters.

اندازه طول کروموزوم (شماره ۸) با احتساب اندازه ساتلایت بیشتر از بقیه کروموزوم‌ها بود و همانند دیگر کروموزوم‌ها، جمعیت cv. Maragheh بیشترین و کلون‌های توده Eğirdir-2 کمترین اندازه طول را دارا بودند. بزرگترین ساتلایت در جمعیت cv. Maragheh و کلون توده Sultandağı-1 به ترتیب ۱/۳۵ و ۱/۴ میکرومتر مشاهده شد. چنین به نظر می‌رسد که اثر تغییرات موجود در دیگر کروموزوم‌ها در این کروموزوم ساتلایت دار بیشتر ظاهر شده و تنوع اندازه ساتلایت و تیپ این کروموزوم مؤید این می‌باشد.

وجود کروموزوم‌های B و کروموزوم‌های هترومورف (تیپ متفاوت کروموزوم‌ها) در همولوگ‌ها (Zarifi *et al*., 2018) و تیپ‌های متاسانتریک و ساب متاسانتریک در ترادهای همولوگ مشاهده شد. در همولوگ کروموزوم‌های شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ و گاهی در کروموزوم‌های ساتلایت دار تفاوت تیپ کروموزوم‌ها به‌طور واضح مشاهده شد. تغییرات تیپ کروموزوم‌ها درنمونه های مورد مطالعه متأثر از فرایندهای تکامل کروموزومی، ترانسلوکاسیون، وارونگی، حذف و تکرار، مؤید این نتیجه می‌باشد. هتروژنی و دگرگشنی کلونها با تفاوت‌های موجود در سطح کروموزوم آنها (کروموزوم B و هترومورف) و کروموزوم‌های با تیپ‌های مختلف خصوصاً تیپ ساب متاسانتریک در همولوگ‌های ۱، ۲،

۳ و ۴ و همچنین تفاوت اندازه ساتلایت در کروموزوم‌های کلون‌های توده ها آشکار شده است (Zarifi *et al*., 2018).

تجزیه واریانس پارامترهای کاریوتیپ کلون‌های حاصل از توده‌های یونجه (*Medicago sativa* L.)

بر روی داده‌های پارامترهای کاریولوژیک به دست آمده از کلونها ی توده ها ابتدا آزمون نرمالیتی انجام شد سپس بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه واریانس انجام شد. در این آزمایش یک جمعیت از ایران بنام cv. Maragheh به‌عنوان شاهد اضافه شد و با کلون‌های حاصل از ۱۰ توده در ترکیه، کروموزوم‌های همولوگ (تتراد کروموزوم) هشت جفت کروموزوم آنالیز شد و علاوه بر این اثر متقابل نیز در تجزیه واریانس وارد شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در بین تمام پارامترهای کاریولوژیکی کلون‌های توده‌ها در سطح P<0.01 تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۴).

تنوع مورد نظر در بین نمونه های مورد مطالعه مشاهده شد. به‌جز میانگین طول کروموزوم (TL)، اثر متقابل کروموزوم و کلون برای همه صفات تفاوت معنی‌داری نشان داد و این تفاوت معنی‌دار، یکنواخت نبودن تغییرات طول ساتلایت کروموزوم‌ها، نسبت بازوها، طول بازوهای بلند و کوتاه را از کلونی به کلون دیگر اثبات نمود؛ بنابراین استنباط می‌شود که فرایند تکامل به وجود آمده در کروموزوم‌های کلون‌های توده‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی شبیه هم نبوده است.

در بین کلون‌های مطالعه شده بیشترین مقدار میانگین طول کروموزوم (TL) (۰/۰۷± ۴/۵۸ و ۰/۱۲± ۳/۹۹) (μm)، طول بازوی بلند (L) (۰/۰۶± ۲/۵۷ و ۰/۰۸± ۲/۲۱) (μm) و بازوی کوتاه (S) (۰/۰۴± ۱/۸۵ و ۰/۰۵۱± ۱/۶۱) (μm)، به ترتیب مربوط به جمعیت CV. Maragheh ایران و کلون توده Sultandağı-1 بود (جدول‌های ۲ و ۳) و بیشترین طول کل کروموزوم‌های مجموعه هاپلوئیدی (TC) (۰/۱۳۱± ۳۶/۶۵) (μm) مربوط به جمعیت CV. Maragheh و (۰/۱۳۹± ۳۱/۹۵) (μm) کلون توده Sultandağı-1 بود و کلون Eğirdir-2 نسبت به بقیه، دارای کمترین مقدار طول کل کروموزوم‌های مجموعه هاپلوئیدی (TC) (۰/۰۹۵± ۱۸/۸۸) (μm) بود (جدول ۳). بزرگترین کروموزوم ماهواره دار در کلون توده Sultandağı-1 مشاهده شد که اندازه ماهواره در این نمونه بر روی بازوی کوتاه بیشتر از اندازه طول بازوی آن و حتی دو برابر آن بود (جدول ۲ و شکل ۲).

ویژگی‌های مورفولوژیکی کروموزوم‌های کلون‌های حاصل از توده های یونجه در جدول ۲ نمایش داده شده است. در بررسی‌های کاریوتیپ کلونها دو تیپ کروموزوم (متاسانتریک (m) و ساب متاسانتریک (sm)) بیشتر مشاهده شد و در میان این تیپ‌ها، تیپ

جدول ۴- تجزیه واریانس (ANOVA) پارامترهای کروموزومی کلون‌های حاصل از توده‌های یونجه؛ میانگین طول کروموزوم (TL)، طول بازوی بلند (L)، طول بازوی کوتاه (S)، نسبت بازوها (AR=L/S)، شاخص سانترومری (CI) و میانگین طول ساتلایت (SAT).

Table 3. Analysis of variance of chromosomal parameters in clones from Alfalfa accessions; The mean length of chromosomes (TL), L: Length of the long arm of the chromosome (µm), S: Length of the short arm of the chromosome (µm), armratio (L/S), CI: Centromer index, The mean length of satellite (SAT).

		درجه آزادی	MS میانگین مربعات					
S.O.V.	منبع تغییرات	df	TL	L	S	AR=L/S	CI	SAT
Clones (Cl)	کلون	10	24.71**	7.98**	3.86**	0.112**	13.27ns	0.654**
Chromosome (Ch)	کروموزوم	7	11.81**	5.74**	1.56**	3.24**	3530.99**	
Cl×Ch	کلون × کروموزوم	70	0.137ns	0.109ns	0.103**	0.237**	88.82**	
Error	خطا	868	0.246	0.092	0.046	0.034	9.33	0.009
C.V (%)	درصد ضریب تغییرات		15.82	17.66	16.66	13.61	7.32	6.8

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns: غیر معنی‌دار

*, **: Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.
ns: Not- significant

متاسانتریک (m) غالب بود. تفاوت‌های مهم موجود در طول کروموزوم‌ها و نسبت بازوهای آنها، بوجود آمدن تغییرات کمی در ماده کروماتین (DNA) را در جریان تنوع نمونه ها آشکار می کند. بر اساس تعداد کروموزوم‌های متاسانتریک (m) موجود در کاریوتیپ، کلونهای توده ها به سه گروه کلاس‌بندی شدند: ۱. کلون‌هایی که در کاریوتیپ آنها ۲۰ عدد کروموزوم متاسانتریک (m) وجود دارد (تنها کلون توده Yeşilova-3)، ۲. کلون‌هایی که در کاریوتیپ آنها ۲۴ کروموزوم متاسانتریک (m) وجود دارد (Bucak-2، Çay-2، Beyşehir-1 و cv. Maragheh). ۳. کلون‌هایی که در کاریوتیپ آنها ۲۸ کروموزوم متاسانتریک (m) وجود دارد (Eğirdir-2، Karaağaç-2، Ş. Yalvaç-3، Senirkent-2، Sultandağı-1 و Bolvadin-3) (جدول ۳).

پارامترهای تقارن و عدم تقارن کاریوتیپی کلون‌های حاصل از توده‌های یونجه

از پارامترهای مؤثر در تشخیص عمومی مورفولوژی کروموزوم‌ها، شاخص‌های تقارن و عدم تقارن کاریوتیپی می‌باشد؛ بنابراین، دستیابی به یک سیستم هماهنگ برای مقایسه کاریوتیپ گونه‌ها و ژنوتیپ‌های خویشاوند یک مزیت محسوب می‌شود. پارامترهای کاریوتیپ و اجزای مختلف آن، به‌عنوان معیار رمزگشایی روند تکامل در تاکسون‌ها می‌باشند. محل سانترومر و طول نسبی کروموزوم‌ها، دو ویژگی مهم کاریوتیپ در ارزیابی منطقی شباهت کروموزوم‌ها بر اساس مفهوم تقارن در مقابل عدم تقارن می‌باشند. متکامل بودن کاریوتیپ‌های نامتقارن نسبت به کاریوتیپ‌های متقارن، توسط (Stebbins, 1971) پیشنهاد شده است و معمولاً، تغییرات موجود در کاریوتیپ‌های متقارن با از دست دادن کروماتین مرتبط می‌باشد.

کلاس‌بندی کاریوتیپ‌های کلون‌های حاصل از توده ها بر اساس روش استبینز (Stebbins, 1971)، به شکل‌های 1A، 2A، 1B و 2B کلاس‌بندی شدند (جدول ۳). علاوه بر این جهت بررسی جزئیات بیشتر تقارن کاریوتیپی در کلونها پارامترهای دیگری نیز مانند؛ A1 شاخص نامتقارن درون کروموزومی (intrachromosomal asymmetry) و A2 شاخص نامتقارن میان کروموزومی (interchromosomal asymmetry) (Zarco, 1986)، در صد شکل کلی کاریوتیپ (TF%) (Huziwara, 1962)، ضریب تغییرات (CV%)، شاخص پراکندگی کاریوتیپ (DI) (Lavania and Srivastava, 1999, 1992) و اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) در جدول ۳جدول ۳ ارائه شده است. ضریب تغییرات در نمونه های مورد مطالعه از ۲۳/۶۴٪ در کلون توده Sultandağı-1 ($28m+ 4sm^{sat}$) تا ۸/۳۵٪ در جمعیت cv. Maragheh ($24m+ 4sm+ 4sm^{sat}$) متغیر بود.

نتایج محاسبات انجام شده بر روی شاخص

تقارن دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL)، بیشتر بودن این مقدار (DRL) عدم تقارن کاریوتیپ را توضیح می‌دهد بنابراین در این مطالعه کلون‌های توده Bucak-2 (۴/۶۳)، Yalvaç-3 (۵/۲۳) و Bolvadin-3 (۵/۱۳) با داشتن مقدار بیشتر دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) دارای کاریوتیپ نامتقارن بودند. بقیه نمونه ها بر اساس این شاخص، کاریوتیپ نسبتاً متقارن داشتند (جدول ۳). از نظر شاخص درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF%)؛ کلون‌های توده Bolvadin-3 (۴۱/۵۸)، Senirkent-2 (۴۱/۷۲) دارای بیشترین درصد می‌باشند به عبارتی سانترومرها در وسط کروموزوم‌ها قرار گرفته‌اند و بیشتر کروموزوم‌ها در کاریوتیپ آنها متاسانتریک بوده و این کلونها تقارن بیشتری را نشان دادند (Huziwara, 1962).

در روش‌های اندازه‌گیری عدم تقارن کاریوتیپ، با توجه به اینکه خصوصیات متفاوت کروموزوم‌ها در ارزیابی بکار می‌رود لزوماً نتایج مشابهی به دست نخواهد آمد. نتایج ضریب تغییرات (CV%) در یازده نمونه یونجه (یک جمعیت و کلون‌های حاصل از ده توده) مورد مطالعه نشان داد که این تغییرات از ۸/۳۵٪ تا ۲۳/۶۴٪ بود (جدول ۳). داده‌های به دست آمده برای این شاخص از اندازه‌گیرهای طول کروموزوم‌های متافازهای مختلف از سلول‌های کلون‌ها بوده و حتی تغییرات طول کروموزوم‌ها در سلول‌های مختلف هم لحاظ شد. بر اساس این نتایج جمعیت cv. Maragheh، کلون توده Beyşehir-1، Bolvadin-3، Eğirdir-2 و Yeşilova-3 به جهت داشتن کمترین ضریب تغییرات (CV%) دارای کاریوتیپ متقارن هستند و طول کروموزوم‌ها در این نمونه ها منظم بود. کلون توده Sultandağı-1 با داشتن بیشترین ضریب تغییرات (CV%) (۲۳/۶۴٪) دارای بیشترین کاریوتیپ نامتقارن می‌باشد (جدول ۳).

شاخص پراکندگی کاریوتیپ (DI)، پتانسیل تشخیص هر نوع تغییرات کوچک در کاریوتیپ را دارا بوده و هر چه مقدار این شاخص در کاریوتیپ بیشتر باشد آن کاریوتیپ پیشرفته‌تر، تخصصی‌تر و تکامل‌یافته‌تر می‌باشد (Lavania and Srivastava, 1999, 1992). شاخص پراکندگی، در مقایسه با تغییرات تدریجی طول کروموزوم و تغییر محل قرار گرفتن سانترومر در مجموعه کاریوتیپ تشخیص داده می‌شود بنابراین درجه‌بندی کلاس‌های تقارن کاریوتیپ استبینز (Stebbins, 1971) را تقویت می‌کند. نتایج در جدول ۳ ارائه شده است: کلون‌های توده Sultandağı-1، Çay-2، Senirkent-2، Yalvaç-3، Bucak-2 و Karaağaç-2 .Ş با بیشترین مقدار شاخص پراکندگی کاریوتیپ صاحب کاریوتیپ نامتقارن زیاد و پیشرفته از نظر تکاملی بودند و دیگر کلونها شاخص پراکندگی کمی و در نتیجه کاریوتیپ متقارن‌تری را نشان دادند. این شاخص، در تعیین

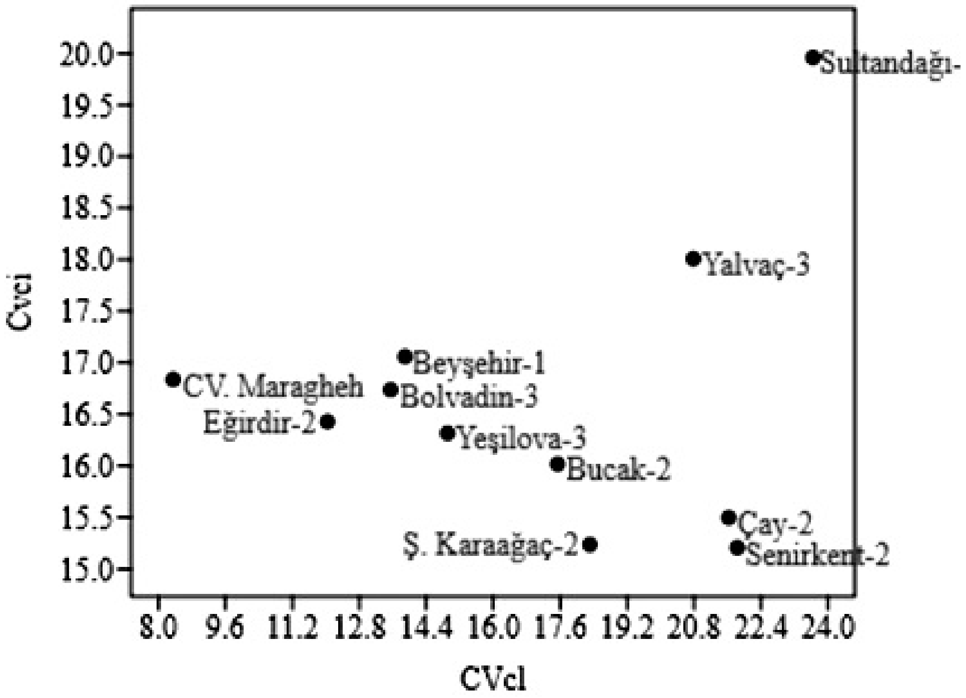
تاکسونومی گونه‌ها و بین آنها، به‌ویژه در روابط بین گونه‌های نزدیک همانند دیگر پارامترهای سیستماتیک می‌توانند مفید واقع شوند (Lavania and Srivastava, 1999, 1992).

برای بررسی بیشتر تقارن و عدم تقارن کاریوتیپ و تفاوت آن در کلون‌های حاصل از توده های یونجه (*Medicago sativa* L.) از روش‌های دیگری از جمله روش زارکو (Zarco, 1986) و روش ارائه شده توسط پاسزکو (Paszko, 2006) نیز استفاده شده است (شکل‌های ۳ و ۴). مقدار A1 در این مطالعه از ۰/۲۱ تا ۰/۲۷ متغیر بود و در جدول ۳ نشان داده شده است. کمترین مقدار A1 مربوط به کلون توده Bolvadin-3، متقارن‌ترین کاریوتیپ و کلون‌های توده Sultandağı-1، Yalvaç-3 و جمعیت cv. Maragheh با داشتن بیشترین مقدار نامتقارن‌ترین کاریوتیپ را دارا می‌باشند (جدول ۳ و شکل ۳).

با توجه به داده‌های A1، در کلون‌های توده های Sultandağı-1، Yalvaç-3 و جمعیت cv. Maragheh، تفاوت درون کروموزومی (Intrachromosomal) بالا بود (تفاوت در بازوهای کروموزوم) و برعکس این اتفاق در کلون Bolvadin-3 رخ داده است. در بررسی پارامتر A2، مقدار آن در نمونه های مورد مطالعه از ۰/۰۸۰ تا ۰/۱۳۴ متغیر بود. بیشترین مقدار A2 در کلون‌های توده های Bolvadin-3، Yalvaç-3، Bucak-2 و Çay-2 مشاهده شد؛ بنابراین تفاوت طول در کروموزوم‌های مختلف این کلونها بیشتر بوده است؛ اما برعکس در جمعیت cv. Maragheh، توده Ş. Karaağaç-2 و Yeşilova-3 مقدار A2 کمتر بوده و تفاوت کمتری در بین طول کروموزوم‌هایشان مشاهده گردید (جدول ۳).

عدم تقارن کاریوتیپ بر اساس هشت شاخص یا روش مختلف بر روی کاریوتیپ کلون‌های حاصل از توده‌های یونجه در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۳). از این روش‌ها یک روش کیفی و هفت روش دیگر به‌صورت شاخص کمی بودند. به‌علاوه از شاخص As که توسط (Paszko, 2006) ارائه شده است و عدم تقارن کاریوتیپ کلون‌های حاصل از توده های یونجه را بهتر نمایان می‌ساخت استفاده شد؛ در این شاخص از پارامترهای جدید CV_{CI} (تغییر نسبی در شاخص سانترومری) و CV_{CL} (تغییر نسبی در طول کروموزوم) که هتروژنی طول کروموزوم‌ها و محل و موقعیت سانترومر در کاریوتیپ اندازه‌گیری می‌شود استفاده شده و نتایج ارزیابی این شاخص در شکل ۴ آورده شده است و گروه‌بندی نمونه ها در مقایسه با دیگر شاخص‌های عدم تقارن کاریوتیپ بهتر نشان داده است.

عدم تقارن کاریوتیپ موجود در کلون‌های حاصل از توده های یونجه مطالعه شده، فرایند دائمی و مستمر تکامل و اثرات آن را نشان می‌دهد (Stebbins, 1971). از نظر تکامل، گونه‌های گیاهی پیشرفته‌تر و از نظر کاریوتیپ



شکل ۲- نمودار پراگندگی شاخص عدم تقارن کاریوتیپ As، CVCI (تغییر نسبی در شاخص سانترومری) و CVCL (تغییر نسبی در طول کروموزوم) در کلونهای حاصل از توده های یونجه (Paszko, 2006).

Fig. 4. Scatter diagram for studied clones from alfalfa accessions based on As: karyotype asymmetry index; CV_{CL}: coefficient of variation of chromosome length; CV_{CI}: coefficient of variation of centromeric index (Paszko 2006)

نامتقارن‌تر هستند و این وضعیت نامتقارنی کاریوتیپ نتیجه افزایش جابجایی قطعات کروموزوم‌ها بوده است (Stebbins, 1971).

با توجه به اندازه‌گیری پارامترهای تقارن کاریوتیپ، همان‌طور که عدم شباهت کاریوتیپ، مانع دو رگ گیری موفق بین گونه‌ها و جمعیت‌ها می‌شود، ممکن هست در تولید و باروری بذر مناسب نیز شکست بخورد. به عبارتی دیگر، نتاج به دست آمده از این چنین ادغام‌ها بیشتر نابارور هستند (Richards, 1986; Sharma, 1994).

همبستگی بین صفات مختلف سیتوژنتیک در (جدول ۵) نشان داده شده است. در پارامترهای کروموزومی، طول بازوی بلند (L)، طول بازوی کوتاه (S)، میانگین طول کروموزوم (TL) و طول کل کروموزوم مجموعه هاپلوئیدی (TC) همبستگی بسیار زیاد مثبت و معنی‌داری را با یکدیگر نشان دادند. از طرفی وجود ارتباط یا همبستگی مثبت میانگین طول کروموزوم (TL) با نسبت بازوها (AR = L/S) از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به اینکه همبستگی TL و TC با نسبت بازوها (AR = L/S) کم شده

جدول ۵- ضریب همبستگی پارامترهای کروموزومی کلونهای حاصل از توده‌های یونجه بررسی شده؛ شاخص پراگندگی کاریوتیپ (DI)، شاخص درجه نامتقارنی کاریوتیپ (AI) (Watanabe *et al*., 1999) و شاخص نامتقارنی کاریوتیپ (As).

Table 4. Pearson correlations for asymmetry indices and karyotype characteristics; The karyotype asymmetry index (AI), The dispersion index (DI) and difference of range of relative length (DRL), As: Karyotype asymmetry index.

Parameter	پارامتر	میانگین طول کروموزوم TL	طول کل کروموزوم TC	بازوی بلند L	بازوی کوتاه S	نسبت بازوها AR	شاخص سانترومری CI	ماهواره SAT	ضریب تغییرات CV%	دامنه طول نسبی DRL	در صد شکل کلی TF%	شاخص پراگندگی DI	درجه نامتقارنی AI	شاخص نامتقارنی As
TL	میانگین طول کروموزوم	1												
TC	طول کل کروموزوم	0.999**	1											
L	بازوی بلند	0.998**	0.998**	1										
S	بازوی کوتاه	0.999**	0.999**	0.995**	1									
AR	نسبت بازوها	0.565*	0.562*	0.605*	0.524*	1								
CI	شاخص سانترومری	-0.654*	-0.651*	-0.693**	-0.618*	-0.951**	1							
SAT	ماهواره	0.877**	0.878**	0.857**	0.882**	0.338	-0.384	1						
CV%	ضریب تغییرات	0.078	0.076	0.062	0.083	0.044	0.061	0.102	1					
DRL	دامنه طول نسبی	-0.453	-0.452	-0.476	-0.444	-0.401	0.572*	-0.203	0.264	1				
TF%	در صد شکل کلی	-0.668*	-0.667*	-0.699**	-0.630*	-0.938**	0.910**	-0.546*	0.028	0.335	1			
DI	شاخص پراگندگی	-0.262	-0.264	-0.245	-0.276	0.061	-0.124	-0.321	0.192	-0.541*	0.047	1		
AI	درجه نامتقارنی	0.561*	0.558*	0.606*	0.525*	0.954**	-0.977**	0.246	-0.073	-0.549*	-0.866**	0.123	1	
As	شاخص نامتقارنی	0.179	0.178	0.168	0.174	0.233	-0.077	0.248	0.945**	0.267	-0.195	0.123	0.042	1

* و ** : به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

* and ** : Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

است؛ تغییرات کمی کروماتین مهم‌ترین عامل در طول کل کروموزوم بوده و اما تغییرات ساختاری کروموزوم‌ها تأثیری در تنوع طول کل کروموزوم‌ها نداشته است. همبستگی بازوی بلند بیشتر با بازوی کوتاه و نسبت بازوها (AR = L/S) بود و نسبت بازوها (AR = L/S) همبستگی منفی بالا و معنی‌داری با شاخص سانترومری (CI) و در صد شکل کلی کاریوتیپ (TF%) نشان داد.

هنگامی که همبستگی معنی‌داری بین ویژگی‌های متعدد سیتوژنتیکی رخ می‌دهد، نشان می‌دهد که بین ژنوتیپ‌ها تنوع زیادی در این صفات وجود ندارد و اما وقتی که همبستگی این ویژگی‌ها کم بوده و یا غیر معنی‌دار، در آن صورت ژنوتیپ‌ها تنوع لازم و بالایی را در صفات نشان داده و این تنوع را ژنوتیپ‌ها در طول مراحل میوز مورد استفاده قرار خواهند داد.

روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌طور گسترده‌ای برای نشان دادن و توضیح تنوع ژنتیکی و سیتوژنتیکی استفاده می‌شود. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس داده‌های پارامترهای کاریوتیپ کلون‌های توده ها در این تحقیق نشان داد که حدود ۸۲/۳۶۹٪ از تغییرات موجود در داده‌های صفات کاریوتیپ، در سه مؤلفه اول بوده (جدول ۶).

مجموع ضرایب تعیین ویژه $\sum r^2$ در این سه مؤلفه بسیار بالا بوده (۰/۹۶۳-۰/۷۲۲) و نشان می‌دهد این سه مؤلفه به‌خوبی واریانس و تنوع موجود در بین نمونه ها را تبیین می‌کند، از طرفی نشان می‌دهد که بالا بودن مقدار این ضرایب، بر اساس ماتریس همبستگی آنالیز این مؤلفه‌ها به‌خوبی انجام شده است. دو مؤلفه اول که ۶۳/۲۲٪ از تغییرات و تنوع کل را نشان می‌دهد در یک بای پلات نشان داده شده است (شکل ۵). اولین مؤلفه (۳۲/۳۶۴٪) تأکید بر تغییرات طول در کاریوتیپ دارد، درحالی‌که مؤلفه دوم (۳۰/۸۶۰٪) تغییرات موقعیت سانترومر را با اهمیت خاصی که می‌تواند بیشترین و مؤثرترین واریانس را آشکار کند نشان می‌دهد.

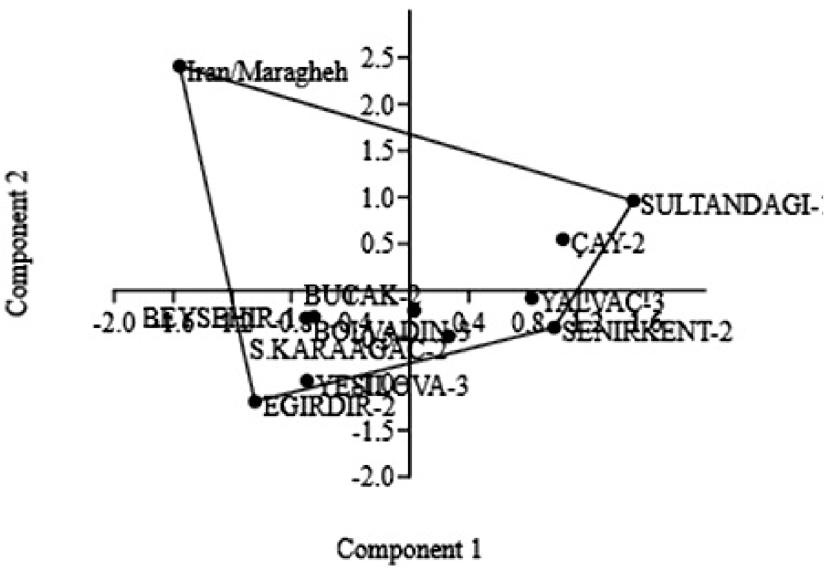
در آنالیز کلاستر، کلون‌های حاصل از توده‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) مورد مطالعه با استفاده از آزمون F و میانگین K در ۴ گروه جدا کلاس‌بندی شدند (شکل ۶). این گروه‌بندی نمونه‌ها با گرافیک دوبعدی مؤلفه‌های اصلی تقریباً نتایج یکسانی را نشان دادند؛ بنابراین جمعیت یونجه ایران Maragheh .cv با توجه به خصوصیات کاریوتیپ و پارامترهای مهم تقارن و عدم تقارن، این جمعیت با فاصله زیادی از نظر ژنتیکی و شباهت کاریوتیپی کاملاً مجزا بوده و در یک گروه جداگانه قرار گرفت و می‌توان گفت این جمعیت دارای ژنوم متفاوت از نظر جغرافیایی با دیگر نمونه‌ها می‌باشد. کلون توده Sultandağı-1 از کشور ترکیه نیز با فاصله زیادی در گروهی جدا به همراه نمونه Çay-2

جدول ۶- بردارهای ویژه سه مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) پارامترهای کاریوتیپی در کلونهای حاصل از توده های یونجه

Table 5. Eigen vectors of the first three principal components (PCA) of karyotypic parameters to classify alfalfa accessions

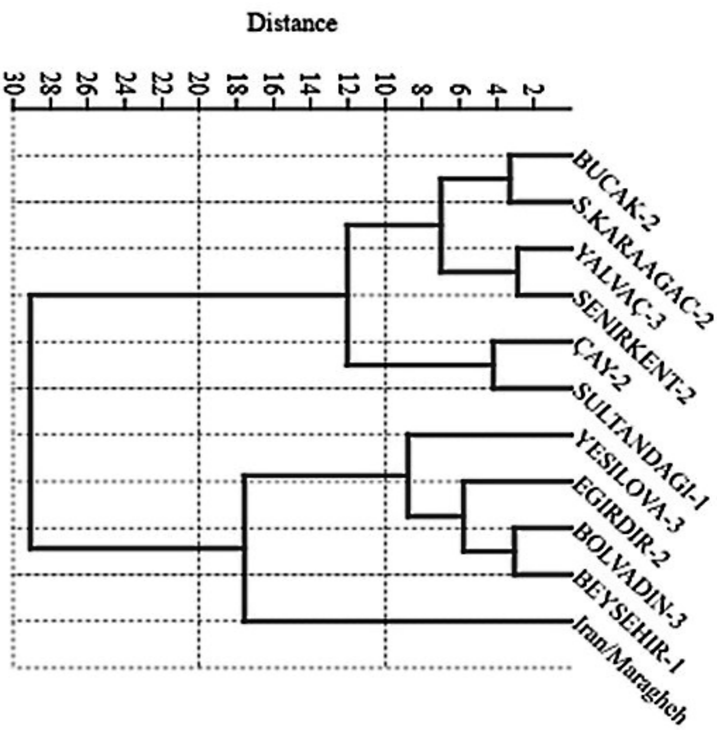
Parameters	پارامترها	Components مولفه‌ها			
		1	2	3	$\sum r^2$
Short Arm (S)	بازوی کوتاه	0.942**	0.227	0.050	0.941
TC	طول کل کروموزوم	0.940**	0.262	0.056	0.955
TL	میانگین طول کروموزوم	0.939**	0.264	0.058	0.955
Longh Arm (L)	بازوی بلند	0.929**	0.312	0.052	0.963
Sat	ماهواره	0.915**	-0.011	0.099	0.847
AI	شاخص درجه نامتقارنی	0.376	0.878**	0.034	0.913
A1	نامتقارن درون	0.444	0.853**	0.076	0.931
CI	شاخص سانترومری	-0.486	-0.840**	-0.057	0.945
Armratio(AR)	نسبت بازوها	0.429	0.808**	0.202	0.878
TF%	در صد شکل کلی	-0.605	-0.662*	-0.148	0.826
sm	ساب متاسانتریک	-0.267	0.659*	-0.465	0.722
CVcl*CVci/100=As	شاخص عدم تقارن	0.133	-0.025	0.977**	0.973
CV%	ضریب تغییرات	-0.003	-0.106	0.955**	0.923
CVcl	تغییر نسبی در طول کروموزوم	-0.003	-0.106	0.955**	0.923
Eigen value	ارزش بردار ویژه	6.142	5.863	3.638	
% of Variance	در صد واریانس	32.364	30.860	19.145	
Cumulative%	تجمعی	32.364	63.224	82.369	

قرار گرفت و کاریوتیپ این کلون‌ها نامتقارن‌تر از بقیه نمونه‌ها بود. از نظر فاصله در کلاس‌ها و شباهت کاریوتیپ؛ کلون‌های توده‌های Eğirdir-2 و Ş. Karaağaç-2 با Sultandağı-1 بیشترین فاصله و کمترین شباهت کاریوتیپ و همان کلون با کلون توده Çay-2 کمترین فاصله و بیشترین شباهت کاریوتیپ را نشان دادند. برای اینکه بتوانیم در یک خزانه ژنی از این جمعیت‌ها مقدار کافی بذر به دست بیاوریم، به‌جز کلون توده Sultandağı-1 که در ساختار کاریوتیپی خودش احتمال می‌رود کروموزوم هترومورف (کروموزوم شماره یک و پنج) با توجه به تغییرات تیپ و طول این کروموزوم‌ها و اندازه بزرگ ساتلایت (ترانسلوکاسیون) و هم‌چنین از جهات برخی پارامترهای کاریوتیپ، شباهت کروموزومی کمتری (نامتقارن‌تر) با دیگر نمونه‌ها را نشان داده است و این تفاوت‌ها باعث اختلال در مراحل میوز شده و ناباروری را سبب شود و اما بقیه کلون‌ها دارای همولوژی کروموزومی مناسب را دارا هستند و می‌توانند تنوع ژنتیکی بالا و مناسب را در انجام هیبرید مجموعه گروه‌ها با همدیگر که بهترین روش می‌باشد حاصل کنند.



شکل ۳- نمودار پراکنش کلونهای حاصل از توده های یونجه بر اساس دو مولفه اول (63.22%) حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی

Fig. 5. The scatter plot of clones from alfalfa accession based on the first two components (63.22%) of principal component analysis.



شکل ۴- دندروگرام کلاس بندی کلونهای حاصل از توده های یونجه مطالعه شده بر اساس شباهت صفات کاریوتیپی آنها به روش Ward (Cophenetic; r= 0.70).

Fig. 6. The dendrogram of cluster analysis using ward method on karyotype parameters in clones from accessions of alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Cophenetic; r= 0.70)

در مقایسه کاریوتیپ با استفاده از آمار چند متغیره، تفاوت‌های ژنومی موجود در جمعیت‌ها و گونه‌های گیاهی را می‌توان مشخص کرد. جمعیت‌هایی که در گروه‌های دور از هم قرار می‌گیرند، به جهت داشتن تفاوت‌های ژنتیکی بیشتر و در صورت عدم وجود ناباروری از این تفاوت‌ها می‌توان در برنامه‌های به نژادی تنوع ژنتیکی بالایی را تولید کرد. آنالیز کلاستر بر روی تمام صفات اندازه‌گیری شده کاریوتیپ، چهار کلاس را در این تحقیق نشان داد، اما با این حال جمعیت‌های موجود در کلاس‌های مشترک، به جهت داشتن منشأ یکسان می‌توانند تنوع ژنتیکی مناسب را تولید کنند.

در حقیقت، هدف از انجام آنالیزها در این تحقیق اثبات اثر منشأهای ژنتیکی یکسان بر روی خصوصیات و ساختار کروموزوم‌ها نیست؛ زیرا امروزه در سایه روابط بسیار نزدیک مراکز تولید و اصلاح بذور با مراکز کشت و پرورش آنها، حتی در مناطق دور افتاده به راحتی و به مقدار فراوان خرید و فروش بذر انجام می‌شود و این بذر نیز به مقدار زیاد در برنامه‌های به نژادی استفاده می‌شود؛ بنابراین، بیشتر نمونه‌ها از نظر منشأ می‌توانند گذشته ژنتیکی مشترکی داشته باشند و در این نوع مطالعات بهم شبیه دیده شوند. در این مطالعه هدف اصلی پیدا کردن کلون‌های حاصل از توده‌ها و ژنوتیپ‌هایی که از نظر خصوصیات کاریوتیپی شباهت زیادی به هم دارند می‌باشد. در این مطالعه، برای کلاس‌بندی نمونه‌ها از پارامترهای مختلف کروموزومی استفاده شد چون نمونه‌هایی که خیلی دور از هم هستند احتمال می‌رود که باعث غیر هموژن شدن اندازه کروموزوم‌ها شوند.

نتیجه‌گیری

کلون‌های حاصل از توده های یونجه مورد مطالعه دارای ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم و اتوتتراپلوئید بودند و تفاوتی در تعداد نشان ندادند. مهم‌ترین کروموزوم نشانگر در گونه‌ها و جمعیت‌ها، وجود کروموزوم قمردار (NOR) یا مناطق سازمان دهنده هستکی می‌باشد که محل قرار گرفتن این قسمت از کروموزوم در بازوهای کروموزوم نیز از ویژگی‌های تمایزکننده می‌باشد.

در نمونه‌های یونجه مطالعه شده دو جفت ساتلایت بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۸ مشاهده شده است و از نظر اندازه بین کلون‌های توده‌ها اختلاف نشان داد. تیپ کروموزوم‌های دارای ساتلایت (NOR) به غیر از دو کلون توده Ş. Karaağaç-2 و Çay-2 که متاسانتریک (m) بودند در بقیه نمونه‌ها ساب متاسانتریک (sm) مشاهده شدند.

تغییرات و تنوع در ساختار کروموزومی این نمونه‌ها ازجمله کروموزوم‌های هترومورف در کروموزوم‌های همولوگ بود که از نظر تیپ این کروموزوم‌ها متفاوت بودند و تیپ‌های متاسانتریک و ساب متاسانتریک در ترادهای

هومولوگ مشاهده شد. این پدیده بسیار نادر بوده و قبلاً گزارش نشده است. در هومولوگ کروموزوم‌های شماره ۱،۲،۳ و ۴ و گاهی در کروموزوم‌های ساتلایت دار این پدیده به‌طور واضح مشاهده شد. تغییرات تیپ کروموزوم‌ها در کلون‌های حاصل از توده ها مورد مطالعه متأثر از فرایندهای تکامل کروموزومی؛ ترانسلوکاسیون، وارونگی، حذف و تکراری و یا از بین رفتن مقداری از هتروکروماتین DNA مؤید این نتیجه می‌باشد. در این تحقیق گرایش مقدار نسبت بازوها از متاسانتریک به ساب متاسانتریک که در جدول ۲ و شکل ۲ نشان داده شده است و برخی از کلون‌های توده‌ها این پدیده را نشان دادند.

تغییرات تیپ‌های کروموزوم چنین استنباط می‌شود که با توجه به اینکه مناطق آناتولی میانی کشور ترکیه از خاستگاه‌های یونجه می‌باشد و انواع گونه‌های دیپلوئید و واریته‌های تتراپلوئید مدت‌های طولانی در این محل با تغییر در ژنوم خودشان سازگار شده‌اند و وقتی بین گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید هیبریداسیون‌های طبیعی اتفاق می‌افتد ما تغییرات را در ساختار کروموزومی نتاج مشاهده می‌کنیم. در مناطق آناتولی میانی کشور ترکیه خصوصاً در مناطق دریاچه‌ای این کشور که تحقیق حاضر در آنجا اجرا شده است به جهت وجود تنوع اجتماعات زنبورها، دگرگشنی در توده‌ها و گونه‌های یونجه در این مناطق تشویق و آسان شده است.

با بهره‌گیری از مورفولوژی کروموزوم‌های این نمونه ها، می‌توان منشأ یونجه‌های تتراپلوئید را از گونه‌های دیپلوئید و یا زیرگونه‌های آنها استنباط کرد. کروموزوم‌های ساتلایت دار (شماره ۸) در کلون‌های حاصل از توده‌های یونجه مورد مطالعه، از نظر اندازه طول تنوع بین آنها مشاهده شد و این تنوع با تغییرات تیپ کروموزوم‌ها در همولوگهای ۱، ۲،۳ و ۴ متناسب بود و زمانی که اندازه طول ساتلایت بزرگتر و یا هم اندازه طول بازوی کوتاه در شماره ۸ بود تیپ این کروموزوم‌ها به سمت ساب متاسانتریک متمایل می‌شد.

در یازده نمونه یونجه (*Medicago sativa* L.) مورد مطالعه تنها در کلون توده Bucak-2 کروموزوم B، مشاهده گردید (Zarifi *et al.*, 2018) تعداد این کروموزوم‌ها ۲ عدد بود. تفاوت‌های موجود در نمونه‌ها مانند کروموزوم B، هترومورف و کروموزوم‌های با تیپ‌های مختلف خصوصاً تیپ ساب متاسانتریک در همولوگهای ۱، ۲،۳ و ۴ و تفاوت اندازه ساتلایت در کروموزوم‌های جمعیت‌ها دلیل دگرگشنی و هتروژن بودن این نمونه ها را نیز بیان می‌کند و این پدیده قبلاً توسط (McKersie and Bowley, 1993) گزارش شده است. تنوع کروموزومی خصوصاً در همولوگهای ۱، ۲، ۳ و۴ نمایانگر تنوع ژنتیکی در کلون‌های توده ها نیز به حساب می‌آید بنابراین تهیه نقشه ژنتیکی این نمونه ها و استفاده از آن اطلاعات در به نژادی گیاه یونجه

امکان‌پذیر می‌باشد.

معنی‌دار بودن اثر متقابل کلون × کروموزوم در صفات طول بازوی کوتاه (S)، نسبت بازوها (AR = L/S)، شاخص سانترومری (CI) و میانگین طول ساتلایت (SAT) نشان داد که تغییرات در کروموزوم‌های جمعیت‌ها ثابت نبوده و استنباط می‌شود روند تکامل در کروموزوم‌های کلون‌های توده‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق قسمتی از پروژه تحقیقاتی TUBİTAK (شورای پژوهش‌های علمی و تکنولوژیکی ترکیه) به شماره ۱۱۰۲۵۷ و رساله دکتری نگارنده در دانشگاه آنکارا، ترکیه به شماره ۱۰۰۱۸۷۷۷ می‌باشد که بدینوسیله نگارندگان از مسئولین مربوطه سپاسگزاری می‌نمایند.

References

Agayev, Y. M., Zarifi, E., Fernández, J. A. 2010. A study of karyotypes in the *Crocus sativus* L. Aggregate and origin of cultivated saffron. Acta Horticalture 850: 47-54.

Bauchan, G. R., Hossain, M. A. 1997. Identification of alfalfa chromosomes using giemsa banding and image analysis techniques. Pp. 61-62. In: Conventional and Novel Methodologies for Plant Improvement.

Gennur, M. N., Kadapa, S. N., Habib, A. F., Goud, J. V. 1988. Karyomorphological studies in Asiatic cottons. I. Karyotypic analysis of species and races of asiatic cottons based on chromatin content. Cytologia (Tokyo) 53: 97-105.

Huziwara, Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of compositae. VIII. Further studies on the chromosomes of *Aster*. American Journal of Botany 49: 116-119.

Lavania, U. C., Srivastava, S. 1992. A simple parameter of dispersion index that serves as an adjunct to karyotype asymmetry. Journal of Biosciences 17: 179–182.

Lavania, U. C., Srivastava, S. 1999. Quantitative delineation of karyotype variation in Papaver as a measure of phylogenetic differentiation and origin. Current Science 77: 429-435.

Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.

McKersie, B. D., Bowley, S. R., 1993. Synthetic seeds of alfalfa. Pp. 231-255. In: Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement.

Paszko, B. 2006. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices.

Plant Systematics and Evolution 258: 39-48.

Reeves, A. 2001. MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. Genome 44: 439-443.

Richards, A. J., 1986. Plant breeding systems. George Allen & Unwin, London. 529 pp.

Rohlf, F. J., 1988. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system user guide. Applied Biostatistics. 44 pp.

Russelle, M. 2001. Alfalfa after an 8,000-year journey, the "Queen of Forages" stands poised to enjoy renewed popularity. American Scientist 89: 252-261.

Sharma, J. R., 1994. Principles and practice of plant breeding. New Delhi : Tata McGraw Hill Publishing. 599 pp.

Small, E., Bauchan, G. R. 1984. Chromosome numbers of the *Medicago sativa* complex in Turkey. Canadian Journal of Botany 62: 749-752.

Stebbins, L. G. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold Ltd., London. 216 pp.

Veronesi, F., Brummer, E. C., Huyghe, C. 2010. Alfalfa. Pp. 395-437. In: Boller, B., Posselt, U. K., Veronesi, F. (Eds.), fodder crops and amenity grasses. Springer New York, New York.

Watanabe, K., Yahara, T., Denda, T., Kosuge, K. 1999. Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. Journal of Plant Research 112: 145-161.

Yu, F., Lei, Y., Li, Y., Dou, Q., Wang, H., Chen, Z. 2013. Cloning and characterization of chromosomal markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 126: 1885-1896.

Zarco, C. R. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 35: 526.

Zarifi, E., Aghyev, Y., Ghanavati, F., Aminizadeh, Z. 2006. Cytogenetics and evolution of karyotype in wormwood, *Artemisia vulgaris* L. Seed Plant Improvement Journal 22: 1-12.

Zarifi, E., Güloğlu, D. 2016. An improved aceto-iron-haematoxylin staining for mitotic chromosomes in Cornelian cherry (*Cornus mas* L.). Caryologia 69: 67-72.

Zarifi, E., Sevimay, C. S., Albayrak, S. 2018. Karyotype characterization of ten pivotal populations of *Medicago sativa* L. in Turkey. Iranian Journal of Field Crop Sciences 49: 131-149 (in Persian).